

Analisis resistensi *M. tuberculosis* terhadap fluoroquinolon dan penerapan teknik bio-molekuler berbasis nuklir

Analysis of the resistance of *M. tuberculosis* to fluoro-quinolon and the implementation of nuclear based bio-molecular technique.

Mukh. Syaifudin^{1*)} dan Dewi Septiani²

¹Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN; Jl Lebak Bulus Raya No 49, Jakarta 12440

²Program Studi Farmasi, Institut Sains dan Teknologi Nasional;

Abstrak

Tuberkulosis masih merupakan masalah kesehatan masyarakat dengan laju kematian yang tinggi. Persoalan menjadi jauh lebih rumit karena merebaknya *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap obat. Hal ini telah menyebabkan bergesernya perhatian dari obat lini pertama ke obat fluoro-quinolon (FQ) sebagai obat alternatif. Tujuan penelitian ini adalah analisis mutasi untuk uji resistensi bakteri melalui pelacakan asam nukleat menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan *single strand conformation polymorphism* (SSCP). Analisis dilakukan terhadap gen *gyrA* dan *gyrB* yang mengkode DNA gyrase bakteri dan berhubungan erat dengan resistensi FQ pada 100 sampel sputum BTA positif. Sebagai kontrol adalah DNA dari *M. tuberculosis* strain H37Rv. Dari hasil analisis gen *gyrA* diketahui bahwa sebanyak 57 sampel menunjukkan PCR positif dan tidak ada sampel yang resisten FQ. Untuk gen *gyrB*, hanya 12 sampel menunjukkan PCR positif dan tidak ada sampel yang memiliki mutasi penyebab resistensi. Hal ini menunjukkan bahwa FQ dapat dipakai sebagai obat pengganti. Teknik deteksi molekuler diketahui cepat dan spesifik untuk uji resistensi bakteri. Para peneliti membuktikan bahwa pelacakan perubahan DNA yang dilabel radioisotop seperti P-32 lebih sensitif. Diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan dalam menentukan pengobatan secara lebih efektif serta dapat mendukung hasil diagnosa sehingga memperkecil risiko kematian penderita.

Kata Kunci: *M. tuberculosis*, fluoroquinolon, resistensi, PCR, SSCP

Abstract

Tuberculosis (TB) is still a problem in community health with high rate of mortality. The case became much more complicated due to emerge of *Mycobacterium tuberculosis* which are resistant to the drugs. This caused the movement of attention from the first line drugs to fluoro-quinolon (FQ) as alternative drug. The aim of this research was to do analysis the mutation which causing the resistance of bacterial through nucleic acid alterations with polymerase chain reaction (PCR) and single strand conformation polymorphism (SSCP) technique. Analysis was done on *gyrA* and *gyrB* genes encoding DNA gyrase of bacterial and closely related to FQ resistance in 100 of sputa samples of positive BTA test results. DNA of *M. tuberculosis* strain H37Rv was used as control. From analysis on *gyrA* gene it was known that 57 samples were positive PCR and no resistant sample was found. For *gyrB* gene, only 12 of them were positive PCR and again there was no samples had mutation as cause of resistance. These mean that FQ could be used as replacement drug. Molecular detection technique was known fast and specific for assessing bacterial

resistance. Researcher proves that searching for P32-radioisotope labeled DNA alteration was more sensitive. Hopefully this results of experiment can be implemented in medication with more effective and support diagnose results so that it will lowering the risk of patient mortality.

Key words : *M. tuberculosis*, fluoro-quinolon, resistance, PCR, SSCP

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) berkontribusi 26,0% dari seluruh kematian di dunia sehingga harus menjadi prioritas utama yang memerlukan pengobatan tepat (Raviglione, *et al.*, 1995). Prevalensi TB di Indonesia diketahui sebesar 0,24% berdasarkan uji usapan sputum positif, dan merupakan 5,6% dari 7,5 juta kasus TB baru di seluruh dunia pada 1990 (Department of Health, 1999; Karyadi, *et al.*, 2000). Oleh karena itu diperlukan teknik deteksi yang cepat dan spesifik agar dapat dilakukan pengobatan segera. Akan tetapi hal ini terkendala akibat merebaknya TB yang resisten terhadap obat, terutama *multidrug-resistance tuberculosis* (MDR-TB) yakni resisten paling tidak terhadap isoniazid and rifampisin (Iseman dan Madsen, 1992). Pasien MDR-TB memerlukan pengobatan dengan obat lini kedua yang lebih beracun dan lebih tinggi risiko penularannya serta biaya yang lebih mahal (Cohn, *et al.*; Ramaswamy, *et al.*, 1998). Sejumlah besar penelitian telah dilakukan untuk mengetahui dasar-dasar genetika resistensi *M. tuberculosis* yang dapat muncul jika kemoterapi tidak tuntas atau tidak adekuat (Musser, 1995; Piatek, *et al.*, 2000). Deteksi resistensi yang cepat dan tepat menjadi sangat penting antara lain metode berbasis asam nukleat seperti PCR (Kim, *et al.*, 2001).

Fluoro-quinolon (FQ) diperkenalkan pertama kali pada tahun 1984 dan telah digunakan terutama untuk terapi alternatif kasus MDR-TB (Rattan, *et al.*, 1998). DNA gyrase (Gyr), yaitu anggota DNA topoisomerase tipe II, merupakan sasaran utama aksi FQ. Gyr berfungsi memasukkan superkoil negatif dalam molekul DNA sirkular dan meliputi heterotetramer (A₂B₂) yang dikode oleh *gyrA* dan *gyrB* (Rattan, *et al.*, 1998; Higgins, *et al.*, 1978). Dua gen yang mengkode DNA gyrase dalam *M. tuberculosis* tersebut berada berdekatan dalam genome, dengan *gyrB* berada di bagian *upstream* *gyrA* (Unniraman, *et al.*, 2002). Mutasi pada kedua gen ini berhubungan erat dengan resistensi terhadap FQ.

Teknik deteksi konvensional diketahui lambat, prosedurnya panjang dan kurang sensitif sehingga dapat memberikan diagnosa yang salah. Sedangkan teknik molekuler hasilnya dapat diperoleh dalam waktu kurang lebih 2 jam (World Health Organization, 2003; Telenti, *et al.*, 1993). Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, sesuai dengan tugas dan fungsi yang mendukung visi-misinya, sedang mengembangkan teknik biologi molekuler berbasis nuklir yakni menelusuri perubahan asam nukleat yang dilabel radioisotop P-32 melalui teknik *imaging* autoradiografi dan dapat digunakan untuk melengkapi teknik molekuler. Pada beberapa aplikasi, teknik nuklir dapat dikatakan spesifik dan memiliki beberapa kelebihan antara lain lebih sensitif (International Atomic Energy Agency, 2000). Makalah ini menyajikan hasil analisis molekuler yang cepat dan sensitif untuk deteksi resistensi bakteri terhadap obat FQ dengan teknik PCR dan SSCP menggunakan DNA yang diekstrak dari sampel klinis sputum pasien TB.

Metodologi

Sampel klinis

Sebanyak 100 sampel sputum diperoleh dari pasien rawat jalan (36 wanita dan 64 pria; umur berkisar antara 16 dan 60 tahun) di Perkumpulan Pemberantasan Tuberkulosis Indonesia (PPTI), Jl. Baladewa, Tanah Tinggi, Jakarta Pusat. Pasien yang diambil sampelnya tidak diketahui status infeksi HIV atau AIDS tetapi diduga menderita TB berdasarkan hasil diagnosis basil tahan asam (BTA) positif dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen pada sputum. Kriteria spesimen ditentukan berdasarkan hasil pewarnaan tersebut, dan jika sampel mengandung >3 basil maka dikategorikan sebagai BTA positif.

Ekstraksi DNA mikobakteri dari sampel sputum

Isolasi DNA dari spesimen klinis dilakukan dengan prosedur seperti telah ditinjau sebelumnya (Garcia, *et al.*, 2001). Lima ratus mikroliter sputum dicampur dengan volume sama larutan pelisis (NaOH, Na-sitrat dan *N-acetyl L-cysteine*) dalam tabung mikrosentrifus steril dan dikocok dengan

horizontal gyrotary shaker selama 20 menit pada 420 rpm. Setelah disentrifus 10 menit pada 12.000 rpm, pelet dicuci dengan akuadest steril dua kali. Ke dalam pelet ditambahkan larutan TE dan larutan pelisis (guanidin tiosianat, Tris-HCl, EDTA dan Triton-X) dan 20 µL Diatom kemudian dikocok kembali selama 10 menit pada 100 rpm dan disentrifus 2 menit. Setelah dicuci dengan buffer dan etanol 70% dingin masing-masing 2 kali dan aseton satu kali, pelet dikeringkan pada 56 °C. Pada pelet kering ditambahkan larutan TE dan diinkubasi 56 °C selama 10 menit. Setelah disentrifus, supernatannya digunakan untuk *template* PCR. Seluruh prosedur ekstraksi DNA dilakukan dalam *Biological safety cabinet class II*.

Amplifikasi DNA mikobakteri dengan teknik PCR

Sepasang primer oligonukleotida digunakan untuk mengamplifikasi fragmen 342 bp yang spesifik untuk kompleks *M. tuberculosis* yakni *gyrA1*: 5'-CAG CTA CAT CGA CTA TGC GA-3'; dan *gyrA2*: 5'-GGG CTT CGG TGT ACC TCA T-3' (Genoteh, Singapura), serta *gyrBf*: 5'-CCA CCG ACA TCG GTG GAT T dan *gyrBr*: 5'-CTG CCA CTT GAG TTT GTA CA-3' yang menyandi Gyr yang berhubungan dengan resistensi FQ (Takiff, AE., et al., 1994). Amplifikasi dilakukan dengan menambahkan *template* DNA 1-2 µL dan 20 pmol masing-masing primer ke dalam tabung PCR (AccuPower PCR PreMix; Bioneer, Chungbuk, Korea) yang mengandung 1 U of *Taq* DNA polymerase, 250 µM masing-masing deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, dan *gel loading dye*. Volume campuran dibuat menjadi 20 µL dengan akuabidest steril. Kontrol positif adalah DNA dari strain standard *M. tuberculosis* (H37Rv) dan kontrol negatif adalah akuadest. Siklus amplifikasi dilakukan pada *Automated thermal cycler* (Applied Biosystem). Profil siklus adalah denaturasi awal 95 °C selama 5 menit diikuti 30 siklus terdiri dari denaturasi pada 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada 60 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada 72 °C selama 45 detik. Ekstensi akhir dilakukan pada 72 °C selama 5 menit.

Deteksi produk PCR

Produk PCR dielektroforesis pada 1,5% agarose (Invitrogene) yang dilarutkan dalam 0,5X TBE (Tris-borat-EDTA) selama 70 menit. Selanjutnya gel diwarnai dengan merendamnya dalam larutan etidium bromide (0,5 µg/mL) dan divisualisasi pada panjang gelombang 260 nm menggunakan UV transilluminator (Vaber Laumert) dan difoto dengan kamera digital Olympus.

Analisis mutasi gen dengan teknik SSCP

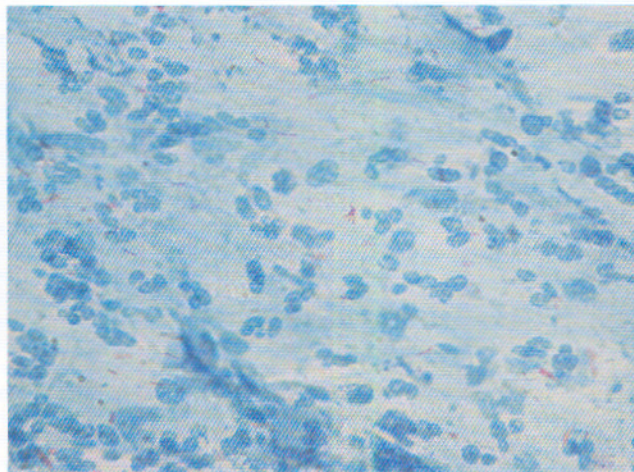
Dalam penelitian ini digunakan metode SSCP untuk melokalisasi DNA mutan. Enam mikroliter produk PCR dicampur dengan 2 µL SSCP *loading dye* dan 4 µL formamide 95% (Biorad) yang mengandung *denaturant urea* (Biorad). Sampel didenaturasi pada 95 °C selama 4 menit dan kemudian diletakkan di atas es serta dielektroforesis pada gel 0,5X *Mutation Detection Enhancement* (MDE) (BMA, Rockland, ME, USA) pada tegangan 100 Volt dan suhu kamar selama 70 menit. Gel MDE diambil dan diwarnai dengan EtBr selama 20 menit dan divisualisasi pada panjang gelombang 260 nm menggunakan UV transilluminator.

Hasil dan Pembahasan

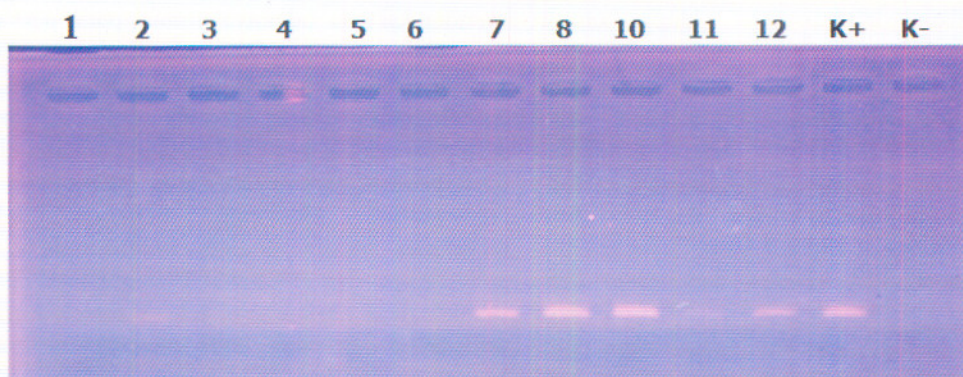
Analisis dilakukan terhadap gen *gyrA* dan *gyrB* yang mengkode DNA gyrase bakteri dan berhubungan erat dengan resistensi FQ pada 100 sampel sputum BTA positif (contoh hasil uji seperti diperlihatkan pada Gambar 1). Tidak ada hubungan langsung antara hasil BTA dengan PCR, artinya untuk sampel BTA positif satu atau bahkan positif tiga ternyata menunjukkan hasil PCR negatif.

Hasil analisis gen *gyrA* diketahui bahwa hanya 57 sampel positif PCR dari 100 sampel yang diuji (Gambar 2) dan tidak ada sampel yang menunjukkan perubahan mobilitas pita DNA pada gel akrilamid sehingga diduga tidak memiliki mutasi gen sebagai penyebab resistensi (Gambar 3). Sedangkan untuk gen *gyrB*, hanya 12 sampel menunjukkan PCR positif dan tidak ada sampel memiliki mutasi gen penyebab resistensi.

TB saat ini menyebabkan kematian tertinggi diantara penyakit infeksi dan merupakan pembunuh utama kelompok usia produktif. TB kembali merebak di awal tahun 1990 yang sebelumnya telah dapat dikontrol dengan menerapkan strategi DOTS yang diadopsi dari Badan Kesehatan Dunia (WHO) oleh Program Gerakan Nasional TB (Gerduas TB) dimana 98% populasi telah dapat dijangkau pada tahun 2001 (World Health Organization, 2003). Risiko dari penyakit ini mencapai puncaknya ketika krisis ekonomi tahun 1998 terutama untuk keluarga miskin, pecandu obat dan pengidap HIV. Sesuai dengan *Fourth Global Report on TB Control*, keberhasilan pengobatan di Indonesia mencapai 54,5% dan laju penemuan



Gambar 1. Hasil pengamatan BTA yang menunjukkan keberadaan bakteri dalam pulasan sputum pasien TB (warna merah).

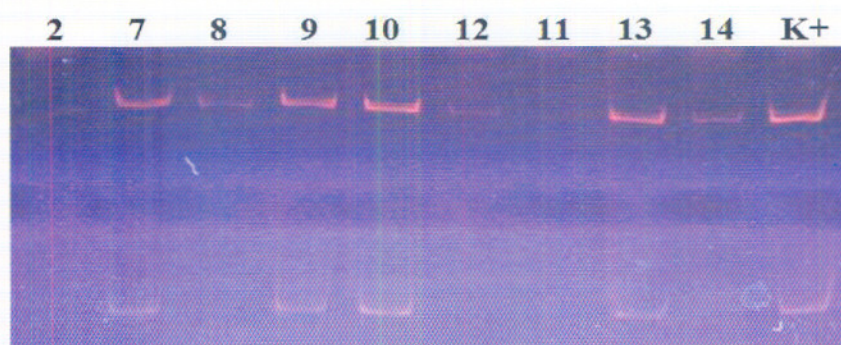


Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA dengan PCR untuk gen *gyrA* untuk uji resistensi *M. tuberculosis* terhadap FQ. K+ dan K- adalah kontrol positif dan negatif.

kasus tahun 1997 menurun drastis dari 94,3% di tahun 1994, namun demikian terjadi perbaikan dalam hal deteksi kasus, penurunan insiden TB dan penyelesaian masalah khusus seperti MDR-TB berdasarkan hasil-hasil penelitian (World Health Organization, 2000).

Dalam penelitian ini, telah dikembangkan teknik molekuler untuk uji resistensi *M. tuberculosis* terhadap obat FQ. Resistensi obat ini dapat disebabkan oleh ketidak patuhan pasien untuk mengikuti petunjuk pengobatan yang justru dapat menyebabkan efek samping obat TB itu sendiri (Farmer, *et al.*, 1999). Frekuensi strain

M. tuberculosis yang resisten terhadap obat pun diperkirakan terus bertambah. Oleh karena itu diagnosa yang cepat dan akurat serta pengobatan TB yang efektif sangat diperlukan. Teknik amplifikasi gen untuk diagnosa *M. tuberculosis* dalam spesimen saluran nafas seperti sputum, ditunjang dengan metode kultur dan usapan BTA telah menjadi perhatian serius para peneliti di negara-negara berkembang seperti Indonesia termasuk peneliti di BATAN yang mencoba mengimplemetasikan teknik nuklir untuk pengendalian penyakit infeksi. Penelitian di luar negeri menunjukkan hasil yang lebih sensitif.



Gambar 3. Hasil analisis SSCP untuk mendeteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap FQ untuk gen *gyrA* non isotopik. Tidak ada sampel DNA yang berubah mobilitasnya yang berarti tidak ada mutasi penyebab resistensi. K+ : kontrol positif.

Teknik molekuler PCR digunakan secara meluas dalam laboratorium klinis untuk mendiagnosa TB pulmonari, ekstra-pulmonari, dan diseminasinya. Berbagai macam pasangan primer telah berhasil digunakan dan beberapa diantaranya dicoba dalam penelitian ini dan penelitian lainnya (Drosten, *et al.*, 2003). Uji PCR dapat digunakan untuk mengidentifikasi secara cepat patogen melalui amplifikasi selektif daerah yang spesifik spesies dan strain dari genom bakteri (Kirschner, *et al.*, 1993). Isolasi *DNA template* dari sputum yang bebas dari semua penghambat adalah komponen esensial dalam uji PCR dan metodenya harus cepat, sederhana dengan proses lisis sel yang baik. Namun teknik PCR ini belum merupakan prosedur standard di laboratorium untuk diagnosa TB. Perlu ditegaskan disini bahwa analisis PCR sebaiknya ditunjang dengan *DNA sequencing* terhadap gen-gen sasaran yang relevan untuk uji MDR-TB. Data hubungan antara fenotip, respon klinis, dan jenis serta posisi mutasi akan menjamin tindakan cepat yang diperlukan untuk membatasi meluasnya transmisi dan infeksi MDR-TB. Dalam penelitian ini telah digunakan teknik PCR yang sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi DNA *M. tuberculosis* dalam spesimen sputum yang paling mudah diperoleh dan juga menyajikan teknik untuk mendeteksi suatu mutasi yang dapat memiliki aplikasi potensial dan menjanjikan untuk deteksi cepat resistensi *M. Tuberculosis* (Chaubert, *et al.*, 1993).

Metode berbasis-PCR seperti SSCP hanya mendeteksi ada tidaknya mutasi pada gen *gyrA* dan *gyrB*, tetapi tidak menentukan jenisnya seperti dalam penelitian ini. Hal ini membatasi kemampuan untuk memperkirakan tingkat resistensi terhadap FQ dan dapat mengarah ke hasil positif- dan negatif-salah (*false-positive* dan *false-negative*). Meskipun beberapa teknik molekuler seperti analisis heterodupleks, *line probe assay*, dan PCR-SSCP digunakan untuk menganalisis mutasi gen, teknik tersebut masih terbatas hanya pada jenis mutasi yang paling banyak ditemukan. Kelebihan lain dari SSCP adalah bahwa banyak produk PCR yang dapat diketahui jenis-jenis mutasi sekaligus dan merupakan metode yang jauh lebih efisien untuk mengetahui polymorphism dalam lokus inti. Spesimen sputum untuk diagnosis TB atau infeksi mikobakteri lain juga telah dilakukan oleh Moore dkk menggunakan *ligase chain reaction* (LCR), ditunjang dengan BTA dan kultur tanpa adanya penghambat dalam spesimen (Jenkin, 1994; Moore, *et al.*, 1998).

Dalam pengembangan teknik deteksi resistensi bakteri terhadap obat berbasis teknik nuklir, yakni autoradiografi, digunakan isotop ^{32}P dengan waktu paro 14 hari untuk melabel DNA dengan aktivitas spesifik sangat tinggi. Ini berarti bahwa sejumlah kecil produk berlabel akan menghasilkan sejumlah besar disintegrasi radioaktif per menit. Satu keunggulan dari ^{32}P adalah isotop ini akan menghasilkan berkas penetrasi partikel beta (elektron) yang memunculkan sinyal/pita yang lebih lebar pada

lembaran film. Isotop ^{32}P dapat diganti dengan ^{33}P yang memiliki waktu paruh dua kali lebih lama sehingga akan menghasilkan gambaran pita yang lebih tajam. Substrat dNTP yang dilabel dengan isotop ini akan memiliki umur lebih lama, tetapi dengan waktu paruh lebih panjang sehingga aktivitas spesifiknya menjadi lebih rendah. Isotop ^{32}P dapat juga diganti dengan isotop ^{35}S dimana unsur sulfur akan mengganti unsur oksigen dalam gugus pospat menghasilkan tio-pospat. Dengan waktu paro lebih lama (85 hari), maka substrat yang dilabel dengan ^{35}S memiliki waktu paro lebih lama dengan peluruhan energetik lebih kecil yang berarti hasil pita pada filmnya lebih tajam (Davis, *et al.*, 1994).

BATAN sedang mengembangkan teknik autoradiografi yang merupakan suatu prosedur yang digunakan untuk mengetahui lokasi dan menemukan suatu senyawa berlabel radioisotop dalam suatu sampel padatan melalui pengambilan gambar dalam emulsi fotografik. Program ini sejalan dengan program IAEA yang memfokuskan pada teknik deteksi menggunakan hibridisasi dot blot (International Atomic Energy Agency, 2000). Dalam aplikasi genetika molekuler, sampel padat seringkali berupa DNA atau protein dengan ukuran terfraksionasi yang terkungkung dalam suatu gel kering, yang di-fix-kan pada permukaan membran nilon atau filter nitroselulosa kering, atau terlokalisasi dalam sampel kromatin atau jaringan yang ditempelkan pada lempengan kaca. Emulsi fotografik terdiri dari kristal perak halida dalam suspensi fase gelatin bening. Setelah melalui emulsi, partikel beta atau sinar gamma yang diemisikan oleh radionuklida, akan merubah ion Ag^+ menjadi atom Ag. Gambaran (citra) laten yang terbentuk dapat dirubah menjadi citra yang dapat dilihat setelah di-develop yaitu proses amplifikasi dimana seluruh

kristal perak halida direduksi menjadi perak metalik. Proses fiksasi menyebabkan kristal perak halida yang terkena pajanan menghasilkan citra autoradiografik dengan representasi dua dimensi akibat pajanan DNA berlabel radioaktif dalam sampel awal (Rogers, 1979).

Skrining mutasi dengan SSCP sebelum *sequencing* dapat memperpendek waktu dan biaya untuk mengidentifikasi mutasi. Jika deret DNA telah diketahui, maka teknik deteksi seperti SSCP merupakan metode yang tepat untuk skrining mutasi yang mungkin terjadi. Metode ini mampu mendeteksi perubahan basa tunggal dan telah diterapkan pada berbagai macam gen, termasuk *gyrA* dan *gyrB* seperti dalam penelitian ini. Deteksi dan amplifikasi mutasi gen yang murah dan 100% efektif merupakan obyek utama dalam genetika molekuler modern. Teknik SSCP adalah teknik yang cepat, cukup sederhana, dapat diulang (*reproducible*) untuk deteksi mutasi seperti delesi, insersi, dan *rearrangement* dalam DNA yang diamplifikasi dengan PCR (Hayashi, 1992; Hayashi, *et al.*, 1993; Ellison, *et al.*, 1993).

Kesimpulan

Analisis resistensi FQ dapat dilakukan dengan mendeteksi mutasi gen *gyrA* dan *gyrB* yang mengkode DNA gyrase bakteri. Dari 100 sampel sputum BTA positif yang diuji, untuk gen *gyrA* diketahui bahwa 57 sampel positif PCR dan tidak ada sampel yang resisten FQ. Sedangkan untuk gen *gyrB*, hanya 12 sampel menunjukkan PCR positif dan tidak ada sampel yang memiliki mutasi penyebab resistensi. Hal ini menunjukkan bahwa FQ dapat dipakai sebagai obat pengganti. Teknik deteksi molekuler diketahui cepat dan spesifik untuk uji resistensi bakteri dan analisis berbasis teknologi nuklir dapat dijadikan sebagai metode yang handal.

Daftar Pustaka

- Chaubert, P., Bastita, D. and Behattar, J., 1993, An improved method for rapid screening of DNA mutations by nonradioactive single-strand conformation polymorphism procedure, *BioTechniques*, 15, 586.
- Cohn, D., Bustreo, F., and Raviglione, M., 1997, Drug-Resistant Tuberculosis: Review of the Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project, *Clinical Infectious Diseases*, 24 (Supplement 1), S121-130.

- Davis, L.G., Kuehl, W.M., and Battey, J.F., 1994, Basic Methods in Molecular Biology, Edisi kedua, Appleton and Lange, USA.
- Department of Health, Republic of Indonesia, 1999, Proposed national health research priorities: the view of National Institute of Health Research and Development (NIHRD). Jakarta, Indonesia. Ministry of Health Republic of Indonesia.
- Drosten, C., Panning, M. and Kramme, S., 2003, Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR using Pan-Mycobacterial primers and a pair of fluorescence resonance energy transfer probes specific for the *M. tuberculosis* complex, *Clinical Chemistry*, 49, 1659-1661.
- Ellison, J., Dean, M. and Goldman, D., 1993, Efficacy of fluorescence-based PCR-SSCP for detection of point mutations, *Biotechniques*, 15, 684-691.
- Farmer, P., 1999, Immodest claims of causality In: Infections and Inequalities: The Modern Plagues, University of California Press, Berkeley, CA; pp. 231-261.
- Garcia, L., Alonso-Sanz, M., Rebollo, M.J., Tercero, J.C., and Chaves, F., 2001, Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1813-1818.
- Hayashi, K. and Yandell, D.W., 1993, How sensitive is PCR-SSCP?, *Human Mutation*, 2, 404-414.
- Hayashi, K., 1992, PCR-SSCP: a method for detection of mutations, *Genet. Anal. Biomol. E.*, 9, 73-79.
- Higgins, N.P., Peebles, C.L., Sugino, A., and Cozzarelli, N.R., 1978, Purification of the subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzyme activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1773-1777.
- International Atomic Energy Agency, 2000, Combating infection in developing countries, Vienna Austria.
- Iseman, M.D. and Madsen, L.A., 1992, Drug-resistant tuberculosis, *Clin. Chest. Med.*, 10, 341-353.
- Jenkins, F.J., 1994, Basic methods for the detection of PCR products, *PCR Methods and Applications*, 3, S77-82.
- Karyadi, E., Schultink, W., Nelwan, R.H.H., Gross, R., Amin, Z., Dolmans, W.M.V., Schiebusch, H., and van der Meer, J. W. M., 2000, Poor Micronutrient Status of Active Pulmonary Tuberculosis Patients in Indonesia, *Journal of Nutrition*, 130, 2953-2958.
- Kim, B.J., Lee, K.H., Park, B.N., Kim, S.J., Bai, G.H., Kim, S.J., and Kook, Y.H., 2001, Differentiation of Mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*), *J. Clinical Microbiology*, 39(6), 2102-2109.
- Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U., Meier, A., Wrede, A., Kiekenbeck, M., Bange, F.C., and Böttger, E.C., 1993, Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory, *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2882-2889.
- Moore, D.F. and Curry, J.I., 1998, Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by Ligase Chain Reaction, *J. Clin. Microbiol.*, 36(4), 1028-1031.
- Musser, J., 1995, Antimicrobial Agent Resistance in mycobacteria: molecular genetic insights, *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 496-514.
- Piatek, A.S., Telenti, A., Murray, M.R., El-Hajj, H., Jacobs, W.R. Jr., Kramer, F.R., and Alland, D., 2000, Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Two Distinct Populations Using Molecular Beacons: Implications for Rapid Susceptibility Testing, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), 103-110.
- Ramaswamy, S. and Musser, J., 1998, Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 Update, *Tubercle and Lung Disease*, 79(1), 3-29.
- Rattan, A., Kalia, A., and Ahmad, N., 1998, Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives, *Emerging Infectious Diseases*, 4(2), 195-210.
- Raviglione, M., Sinder, D., and Kochi, A., 1995, Global epidemiology of tuberculosis-morbidity and mortality of a worldwide epidemic, *JAMA*, 273, 220-226.
- Rogers, A., 1979, Techniques of autoradiography, 3rd Edition. Elsevier, North Holland, p.429.

- Takiff, A.E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W.M., Kreiswirth, B., Cole, S.T., Jacobs, W.R., Jr, and Telenti, A., 1994, Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8, 77-80.
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K., and Bodmer, T., 1993, Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, *Lancet*, 341, 647-650.
- Unniraman, S., Chatterji, M. and Nagaraja, V., 2002, DNA Gyrase genes in *Mycobacterium tuberculosis*: a Single Operon Driven by Multiple Promoters, *J. of Bacteriology*, 184, 5449-5456.
- World Health Organization, 2000, World TB Day 2000: Forging New Partnerships to Stop TB, Jenewa.
- World Health Organizations, 2003, PPM DOTS in Indonesia; A strategy for action. Geneva, Switzerland.

*) Korespondensi: Mukh Syaifudin

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN
 Jl Lebak Bulus Raya No 49, Jakarta 12440
 e-mail: mukh_syaifudin@batan.go.id